

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-112498

(43)Date of publication of application : 14.05.1991

(51)Int.Cl. C12Q 1/68  
 C12Q 1/04  
 // C12N 15/11  
 (C12Q 1/04  
 C12R 1:01 )

(21)Application number : 01-251400

(71)Applicant : SHIMADZU CORP

(22)Date of filing : 27.09.1989

(72)Inventor : OHASHI TETSUO  
 ABE HIROHISA  
 FUKUSHIMA SHIGERU

## (54) OLIGONUCLEOTIDE FOR DETECTING CAMPYLOBACTER JEJUNI AND DETECTION USING THE SAME OLIGONUCLEOTIDE

## (57)Abstract:

PURPOSE: To detect Campylobacter jejuni simply, rapidly and in high sensitivity by applying gene amplification method using an oligonucleotide complementary with a nucleotide sequence to code chromosome gene of Campylobacter jejuni as a primer.

CONSTITUTION: An oligonucleotide to selectively detect Campylobacter jejuni existing in a test specimen or an nucleotide targeting a nucleotide sequence to code chromosome gene of Campylobacter jejuni and chemically synthesized to be complementary with the nucleotide sequence wherein the synthesized nucleotide has sequence shown by formula I, formula II or corresponding complementary sequence is used. An oligonucleotide having at least one of the sequences shown by formula I and formula II is functioned as a primer for chain reaction and a target nucleotide sequence is selectively amplified.

(5') d - A A T A A T C T G A A T C C G  
 A T C G T (3')

(5') d - A T C A G A C C A T C A C C C  
 T T A T C (3')

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision]

of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-112498

⑬ Int. Cl.<sup>5</sup>

C 12 Q 1/68  
1/04

識別記号

ZNA A

庁内整理番号

6807-4B  
6807-4B  
8717-4B

⑭ 公開 平成3年(1991)5月14日

C 12 N 15/00

A※

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全5頁)

⑮ 発明の名称 カンピロバクター検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた検出方法

⑯ 特 願 平1-251400

⑰ 出 願 平1(1989)9月27日

⑱ 発 明 者 大 橋 鉄 雄 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内  
⑱ 発 明 者 阿 部 浩 久 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内  
⑱ 発 明 者 福 島 繁 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地 株式会社島津製作所三条工場内

⑲ 出 願 人 株式会社島津製作所 京都府京都市中京区西ノ京桑原町1番地

⑳ 代 理 人 弁理士 武石 靖彦  
最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

カンピロバクター検出のためのオリゴヌクレオチドおよびそれを用いた検出法

2. 特許請求の範囲

(1) 検体中に存在するカンピロバクター(Campylobacter jejuni)を選択的に検出するためのオリゴヌクレオチド、または、カンピロバクターの染色体遺伝子をコードするヌクレオチド配列を標的とし、そのヌクレオチド配列と相補的となるように化学合成されたオリゴヌクレオチドであって、

合成ヌクレオチドが以下の配列群、

(5') d-AATAATCTGAATCCG  
ATGGT(3')... (a)

(5') d-ATCAGACCATCACCC  
TTATC(3')... (b)

または対応する相補的配列から成ることを特徴とするオリゴヌクレオチド。

(2) 請求項第1項に記載された配列のうち、少なくとも1つを有するオリゴヌクレオチドを鎖長反応のプライマーとして機能させ、標的ヌクレオチド配列を選択的に増幅させることを特徴とする方法であって、

(a) 検体中の1本鎖状態の標的ヌクレオチド配列にプライマーをハイブリダイズさせ4種のヌクレオチドの重合反応により鎖長反応を行わせ、

(b) 得られた2本鎖ヌクレオチド配列を1本鎖に分離した場合、その相補鎖は他方のプライマーによる鎖長反応の鋳型として機能し、

(c) これら2種のプライマーによる同時の鎖長反応、鎖長生成物の鋳型からの分離、そして新たなプライマーによるハイブリダイゼーションを繰り返すことにより特定のヌクレオチド配列が増幅され、電気泳動、クロマトグラフィーで増幅されたヌクレオチド断片を検出し、

(d) その結果、前記検体中に認識されるべき配列が存在しているか否かを判定することでカンピロバクターの検出を行うことを含む方法。

特開平3-112498(2)

(3) 請求項第2項記載の方法における反応物を用いアガロース電気泳動および臭化エチジウムによる核酸染色を行うことによる検出方法。

### 3. 発明の詳細な説明

以下余白

#### [ 産業上の利用分野 ]

本発明は、臨床検査、あるいは食品検査でのカンビロバクターの検出に関するものである。

#### [ 従来の技術と問題点 ]

検査材料が患者の嘔吐物、糞便、食品または拭き取り材料の場合、カンビロバクターと同定するまでには、増菌培養、分離培養を経て同定試験を行わなければならない。同定試験には顕微鏡検査、生化学的性状検査を行わなければならない。各培養段階に要する時間は、18～24時間であり、その後の検査にかかる時間を合計すると3～4日もの長時間を要する。

一方、最近では、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダイゼーション法が試みられるようになってきた。しかし、オリゴヌクレオチドを標識修飾したプローブにより膜上、あるいは他の支持体上でハイブリダイゼーションを行い、これを検出する場合、細菌検査において十分な検出感度と選択性を得るのが難しい。

#### [ 発明の目的 ]

本発明は、オリゴヌクレオチドを核酸合成反応のプライマーとして機能させた遺伝子増幅技術によりカンビロバクター由来の核酸を検出するもので、簡便、迅速かつ高感度なカンビロバクターの検査法を提供することにある。

#### [ 問題点を解決するための手段および作用 ]

本発明は、オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いた遺伝子増幅法でカンビロバクターを選択的に検出することの特徴としている。遺伝子増幅は、Saikiらが、開発したPolymerase Chain Reaction法(以下、略してPCR法; Science, 230, 1350(1985))をもとに行っている。この方法は、ある特定のヌクレオチド配列領域(本発明の場合はカンビロバクターの染色体遺伝子)を検出する場合、その領域の両端の一方は+鎖を他方は一鎖をそれぞれ認識してハイブリダイゼーションするようなオリゴヌクレオチドを用意し、それを熱変性により1本鎖状態にした試料核酸に対し鎖型依存性ヌクレオチド重合反応のプライマーとして機能させ、生成した2本鎖核酸を再び1本鎖に分離

し、再び、同様な反応を起こさせる。この一連の操作を繰り返すことで2つのプライマーにはさまれた領域は検出できるまでにコピー数が増大してくる。検体としては、臨床検査材料、例えば、糞便、尿、血液、組織ホモジネートなど、また、食品材料でもよい。これら材料をPCR反応の試料として用いるには、材料中に存在する菌体から核酸成分を遊離させる操作が前処理として必要となる。しかし、プライマーがハイブリダイズできる核酸が数分子から数十分子以上存在すればPCR反応は進むので、検査材料を溶菌酵素、界面活性剤、アルカリ等で短時間処理するだけでPCR反応を進行させるに十分な核酸量を持った試料液が調製できる。本発明でプライマーとして用いられるオリゴヌクレオチドは、選択性や検出感度および再現性から考えて、10塩基以上、望ましくは15塩基以上の長さを持った核酸フラグメントで、化学合成あるいは天然のどちらでもよい。また、プライマーは、特に検出用として標識されていなくてもよい。プライマーが規定しているカ

特開平3-112498(3)

ンビロバクターの染色体遺伝子における増幅領域は、50塩基から2000塩基となればよい。鋳型依存性ヌクレオチド重合反応には、耐熱性DNAポリメラーゼを用いているが、この酵素の起源については90～95℃の温度で活性を保持していれば、どの生物種由来でもよい。熱変性温度は、90～95℃、プライマーをハイブリダイズさせるアニーリング操作の温度は37～65℃、重合反応は50～75℃で、これを1サイクルとしたPCRを20から42サイクル行って増幅させる。検出は酵素反応液をそのまま、アガロースゲル電気泳動にかけることで増幅された核酸断片の存在およびその長さが確認できる。その結果から、検体中に、プライマーが認識すべき配列を持った核酸が存在しているかどうか判定することができる。この判定は、そのままカンビロバクターの有無を判定するものとなる。増幅された核酸断片の検出には、その他の電気泳動やクロマトグラフィーも有効である。

nmの吸光度の値より換算した核酸量は1μg/mlである。

#### プライマーの作製

特許請求範囲第1項に示した配列(a)、(b)を持つオリゴヌクレオチドを化学合成した。化学合成は島津DNA合成機NS-1を用い、トリエステル法により行った。合成したオリゴヌクレオチド断片の精製はC18逆相カラムを用いて行った。

#### PCR

前記検体液を3μlを用いそれに滅菌蒸留水16.05μl、10×反応用バッファー3μl、dNTP溶液4.8μl、プライマー(1)1.5μl、プライマー(2)1.5μlそして耐熱性DNAポリメラーゼ0.15μlを加え、30μlの反応液を調製した。この反応液の入った容器にミネラルオイル(SIGMA社製)を50μl加え反応液上に重層する。各添加された液の内容を下記に示す。

10×反応用バッファー: 500mM KCl、

[ 実施例 ]

(実施例1)

#### 検体の調製

カンビロバクター用PCRプライマーの性能試験には表1に示した8株のカンビロバクター(Campylobacter jejuni)を用いて下記の方法により検体の調製を行った。カンビロバクターの培養は密閉容器内、GAM培地に植菌し、カンビロバクター用ガス発生袋(BBL社製)によるガス環境下で2～3日培養した。回収した菌体は適当な無機塩緩衝液で洗浄した後、氷冷下、リゾチーム(終濃度1mg/ml)を添加することで溶菌させた。次に、SDS(終濃度1%)とプロテアーゼK(終濃度100μg/ml)を添加し50℃、30分加温し、再び氷冷下に置いた。そして、フェノール処理、エタノール沈澱を行って沈澱物を回収しそれを10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.5)に溶かした物を検体とした。波長260

100mM Tris-HCl(pH8.3),  
15mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1%(w/v)ゼラチン

dNTP溶液: dATP, dCTP, dGTP, dTTPを混合させたもので、各終濃度が1.25mM

プライマー(a)および(b): 前述した化学合成精製品の各水溶液(50DU/μl)

耐熱性DNAポリメラーゼ: Taq DNAポリメラーゼ(5unit/μl; Perkin Elmer Cetus社製)

反応条件は、次の通りである。

熱変性: 94℃ 1分

アニーリング: 37℃ 1分

重合反応: 60℃ 1分

熱変性からアニーリングを経て重合反応に至る過程を1サイクル(所要時間5.7分)とし、これを42サイクル(総所要時間約4時間)行った。これらの操作は、Perkin Elmer Cetus社製 DNA Thermal Cyclerに上記反応条件をプログラムする

特開平3-112498(4)

ことにより行った。

#### 検出

反応液から、増幅されたヌクレオチド断片を検出するため、アガロース電気泳動を以下の様に行った。

アガロースゲルはゲル濃度2%(w/v)とし、臭化エチジウム(0.5μg/ml)を含むものを用いた。泳動の電気的條件は、定電圧100V、時間は30分を行った。操作方法ならびに他の条件はManiatis等、Molecular Cloning(1982)に記載されている技法で行った。反応液の他に分子量マーカーの泳動も、同時に行い、相対移動度の比較により、ゲル中、紫外線光等で検出されたヌクレオチド断片の長さを算出した。

#### 結果

Campylobacter jejuniについては1.2キロ塩基対の大きさの増幅DNA断片が生じた。これは、8菌株の全てに共通した現象であり、カンピロバクターの選択的検出にこのプライマーの組合せが有効であることを強く示唆するものである。

を行い、PCR法に適用しうる試料を調製した。検体の調製において培養した菌は、表2の縦の見出しに示した16菌株である。また、ヒト胎盤由来DNA(Human placenta)は1μg/mlの濃度のもを調製し、これも同様にPCRを行わせた。結果を表2に示す。欄内の数値は増幅されたDNAの大きさを示しており、単位はキロ塩基対である。カンピロバクターと同じ塩基配列を染色体遺伝子内にこの菌種が持っていれば実施例1の結果と同じ長さ(1.2キロ塩基対)のヌクレオチド断片が検出されるはずである。従って、この菌種由来の増幅されたヌクレオチドはカンピロバクターの染色体遺伝子を認識して生成されたものと容易に区別し検出できることがわかる。なお、本発明の実施例にに用いているアガロース電気泳動を前述の泳動条件行えば100塩基対以下の範囲であれば5から10塩基対、100から500塩基対の範囲であれば10から20塩基対のヌクレオチドの長さの違いを区別することができる。さらに、アクリルアミドなどをゲルに用いることで

表 1

菌株名	分子機関番号	
Campylobacter jejuni	JCM2013	1.2
Campylobacter jejuni	ATCC33250	1.2
Campylobacter jejuni	ATCC33251	1.2
Campylobacter jejuni	ATCC33252	1.2
Campylobacter jejuni	ATCC33253	1.2
Campylobacter jejuni	ATCC33291	1.2
Campylobacter jejuni	ATCC33292	1.2
Campylobacter jejuni	ATCC33560	1.2

ATCC: American Type Culture Collection  
JCM: 理化学研究所 微生物系統保存施設

#### (実施例2)

実施例1で得られた結果が、カンピロバクター(Campylobacter jejuni)に対し選択的なものか確かめるため、臨床検査においてカンピロバクター以外で検査対象となり得る菌種について比較検討した。

方法は、実施例1に示したものと同一であるが、Clostridium perfringens, Bacteroides vulgatus, Enterococcus faecalis, Lactobacillus acidophilusについては嫌気的条件下、37℃で終夜培養

ヌクレオチドの長さの測定の精度を向上させれば、選択的検出における信頼度は、さらに高まるものと考えられる。

表 2

菌株名	保存機関略号および株番号	
Campylobacter jejuni	JCM2013	1.2
Campylobacter coli	JCM2529	-
Campylobacter fetus	JCM2527	-
Campylobacter lariidis	JCM2530	0.75
Campylobacter fecalis	ATCC33709	0.75
Campylobacter fecalis	ATCC33710	0.10
Bacillus cereus	JCM2152	2.0
Salmonella typhimurium	IFO12529	-
Escherichia coli	JCM1649	0.35
Staphylococcus aureus	JCM2413	1.5
Vibrio parahaemolyticus	IFO12711	-
Clostridium perfringens	ATCC12917	0.15
Bacteroides vulgatus	JCM5826	-
Yersinia enterocolitica	ATCC9610	-
Enterococcus faecalis	JCM5803	0.40
Lactobacillus acidophilus	JCM1132	0.40
Human placenta		0.45

特開平3-112498(5)

## 〔 発 明 の 効 果 〕

本発明では、PCR法を用いたことで、カンピロバクターの検出において、遺伝子増幅作用による高い検出感度と、2つあるいは、それ以上のプライマーで反応が規定されることによる高い選択性を得ることができる。また、高い検出感度のため多量の検体を必要とせず、検体の前処理が簡便で済む。しかも、反応時間が短く、検出も簡単な機材で済み、操作も容易なため同定までの時間を大幅に短縮できる。~~以下の実施例に示す~~<sup>例えば、</sup>反応時間が4時間、検出にかかる操作が30分である。また、検出にアガロースゲル電気泳動と臭化エチジウムによる核酸染色法をもちいることで、プライマー等に曝露せずに検出が行え、しかも、核酸の長さが確認できるので結果の信頼性が高いものとなる。

特許出願人 株式会社 島 津 製作所  
 代理人 弁理士 武 石 靖 彦  
 印 務 士

第1頁の続き

⑤Int. Cl. <sup>5</sup>

識別記号

庁内整理番号

//(C 12 Q 1/04  
 C 12 R 1:01)  
 C 12 N 15/11